Untersuchung über die Entwicklung von Sarcocystis muris und Sarcocystis dispersa in der Maus und über Reaktionen des Zwischenwirtes nach ein- und mehrmaligen experimentellen Infektionen

Josef Hofer

1981

Aus dem Institut für Vergleichende Tropenmedizin und
Parasitologie der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Prof. Dr. Dr. h.c. J. Boch

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE ENTWICKLUNG VON SARCOCYSTIS MURIS UND SARCOCYSTIS DISPERSA IN DER MAUS UND ÜBER REAKTIONEN DES ZWISCHENWIRTES NACH EIN- UND MEHRMALIGEN EXPERIMENTELLEN INFEKTIONEN

Inaugural Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Josef Hofer
aus
Sellthüren

München 1981

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. J. v. Sandersleben

Referent: Prof. Dr. Dr. h.c. J. Boch

Korreferent: Prof. Dr. U. Lösch

Tag der Promotion: 27. Februar 1981

UNIV. LEIDEN BIBL.

DISSERTATIONS - UND FOTODRUCK FRANK GmbH
8000 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2809090

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

I. Einleitung 1

II. Immunreaktionen bei Sarcocystis-Infektionen im Zwischenwirt sowie Biologie von Sarcocystis muris und S. dispersa der Maus (anhand der Literatur) . . . 2

III. Eigene Untersuchungen 9
A. Material und Methoden 9
B. Ergebnisse 14
1. Einmalige Infektionen 14
a) Sarcocystis muris 14
b) Sarcocystis dispersa 25
2. Mehrmalige Infektionen 27
a) Sarcocystis muris 27
b) Sarcocystis dispersa 29
c) Sarcocystis muris und Sarcocystis dispersa . 30

IV. Besprechung der Ergebnisse 31

V. Zusammenfassung 34
Summary

VI. Literaturverzeichnis 36

Lebenslauf

I. Einleitung

Schon bald nach der Aufklärung des Entwicklungszyklus der Sarkosporidien erkannte man ihre wirtschaftliche Bedeutung, da sich herausstellte, daß die Sarkosporidien für Todesfälle, Aborte und verminderte Gewichtszunahmen bei landwirtschaftlichen Nutztieren verantwortlich sein können.

Viele Arbeiten zur Diagnose der Sarcocystisinfektion mit serologischen und parasitologischen Methoden sowie zur Infektionshäufigkeit und zur Klinik wurden seither durchgeführt. Eingehende Untersuchungen zur Immunität bei Sarcocystis-Infektionen stehen noch aus.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es daher, die Immunreaktionen bei Sarkosporidien im Zwischenwirt anhand der Sarcocystis muris- und S. dispersa-Infektion zu untersuchen.

II. Immunreaktionen bei Sarcocystis-Infektionen im Zwischenwirt sowie Biologie von Sarcocystis muris und S. dispersa der Maus (anhand der Literatur)

Nach der Entdeckung der Kokzidiennatur der Sarkosporidien wurden auch immunologische Vorgänge bei Sarcocystis-Infektionen untersucht. TADROS und LAARMAN (1976) berichten in einer zusammenfassenden Arbeit, daß es ihnen und auch anderen Autoren ohne Schwierigkeiten gelungen sei, im Endwirt nach mehrmaligen Infektionen eine erneute Ausscheidung von Sarcocystis-Sporozysten zu erzielen. Sie vermuten aber, daß im Zwischenwirt durch den engen Kontakt während der Schizogoniephase und durch das lange Persistieren von Parasitenstadien in der Muskulatur eine stärkere Immunisierung als bei der Darmphase eintritt. Auch könnte sich die Ruptur von Zysten bei lange bestehender Infektion als eine Art "Booster-Effekt" in der Abwehr gegen erneute Infektionen auswirken.

Im folgenden Abschnitt wird ein Überblick über die bisher mitgeteilten Immunreaktionen bei verschiedenen Tierarten gegeben.

a) Rind. GESTRICH, MEHLHORN und HEYDORN (1975) infizierten ein Kalb mit 500 000 und ein weiteres Kalb mit 10 Millionen Sporozysten von S. bovifelis. Das erste Tier wurde am 98. Tag nach der Infektion getötet. In der Zungenmuskulatur und im Oesophagus konnten viele Zysten gefunden werden; davon waren 95% dickwandig und 5% dünnwandig. Auch junge Zysten wurden isoliert. Bei dem 160 Tage p.i. getöteten Kalb fanden sie dagegen nur wenige Zysten. Die Autoren vermuten, daß bisher unbekannte Immunisierungsvorgänge oder auch der sogenannte "Crowding-Effekt" eine Rolle spielen könnten.

MEHLHORN, HEYDORN und GESTRICH (1975) infizierten bei weiteren Versuchen 4 Kälber mit S. bovicanis, der gegenüber S. bovifelis pathogeneren Art. Ein Kalb erhielt 50 000 Sporozysten, nach 14 Tagen 100 000, danach 7 x 250 000 Sporozysten pro Woche. 60 Tage vor der Schlachtung wurden dem Tier noch 2 Millionen Sporozysten verabreicht. Am 150. Tag nach der Erstinfektion wurde das Kalb getötet. Ein anderes Kalb wurde mit 100 000 und nach 42 Tagen mit 2 Millionen Sporozysten infiziert. Die Tötung erfolgte 34 Tage nach der Zweitinfektion.

Diese beiden Tiere überlebten also eine Infektion mit 2 Millionen Sporozysten um 34 bzw. 60 Tage, obwohl GESTRICH, HEYDORN und BAYSU (1975) herausgefunden hatten, daß eine Dosis von 2 Millionen bis spätestens zum 30. Tag p.i. letal wirkt. Die Autoren führten aus, daß sie extra, um Todesfälle zu vermeiden, sukzessiv infiziert hatten. Bei der Schlachtung stellten sie fest, daß die Versuchstiere Mischinfektionen aufwiesen, was sie auf Infektionen vor Versuchsbeginn mit wenigen Sporozysten von Katze und Mensch zurückführten.

BOCH, LAUPHEIMER und ERBER (1978) überprüften das Vorkommen von Sarkosporidien bei Schlachtrindern. Dabei konnten sie bei 52,8% aller befallenen Tiere eine Mischinfektion, bei 10,5% sogar eine Dreifachinfektion mit S. bovicanis, S. bovifelis und S. bovihominis nachweisen. Bei einem Versuchskalb, das infiziert wurde, um die Zystenentwicklung von S. bovifelis zu verfolgen, wurden mehrere Biopsien durchgeführt. Die Autoren stellten fest, daß ab dem 100. Tag p.i. die Zahl der Zysten kontinuierlich abnahm; bei der Schlachtung am 160. Tag waren weder Zysten noch Zystozoiten zu finden. Die in gewissen Abständen von diesem Kalb entnommenen Serumproben wurden von KLIMA (1979) im ELISA untersucht. Während der Titer 100 und 114 Tage p.i. 1:128 betrug, fiel er am 160. Tag auf 1:64 ab.

Serologische Untersuchungen bei experimentell infizierten Rindern führten NEDJARI, JUNGMANN und HIEPE (1976) durch. Sie infizierten 6 Kälber mit 250 000 Sporozysten von S. bovicanis und untersuchten die Seren 3 Wochen vor bis 15 Wochen nach der Infektion im IFAT. Die Seren waren erstmalig 4-5 Wochen p.i. positiv. Zwischen der 5. und der 12. Woche stiegen die Titer auf Werte bis 1:640 an und blieben bis zum Ende des Versuchs auf dieser Höhe.

LUNDE und FAYER (1977) untersuchten Seren von 4 mit je 200 000 Sporozysten von S. bovicanis infizierten weiblichen Holstein-Friesian-Kälbern mit Hilfe des IHA. 30 bis 45 Tage nach der Infektion traten Titer auf; diese stiegen bis zu einer Höhe von 1:39 000 am 90. Tag. Da 4 bis 5 Wochen p.i. die Tiere klinische Symptome einer Sarkosporidiose zeigten, folgerten die Autoren, daß Titerhöhen von 1:1458 oder mehr mit großer Wahrscheinlichkeit als diagnostisch signifikant für eine akute Sarkosporidiose beim Rind angesehen werden können.

Den ELISA-Test verwendete KLIMA (1979) zum Nachweis einer Sarcocystisinfektion beim Rind. Sie wies nach, daß zwischen den einzelnen Sarcocystisantigenen (Zystozoitenantigene von S. ovifelis, S. suihominis, S. ovicanis, S. bovicanis, S. bovihominis, S. suicanis, Zystenwandantigen von S. ovifelis, Sporozoitenantigene von S. suicanis und S. spec./Reh) Kreuzreaktionen bestehen. Bei der Überprüfung von 100 Feldseren konnte sie keine Beziehung zwischen der parasitologischen Befallsstärke und der Titerhöhe herstellen. Auch TADROS, HAZELHOFF und LAARMAN (1979) verwendeten den ELISA zum Nachweis zirkulierender Antikörper gegen Sarcocystis in Rinderseren. Als Antigen benützten sie S. bovicanis- und S. cernae-Zystozoiten. Beide Antigene ergaben gleiche Titer. Ferner erbrachte die Untersuchung der Seren mit dem IHA mit S. bovicanis-Antigen vergleichbare Ergebnisse wie der ELISA.

b) Schaf. MUNDAY und RICKARD (1974) versuchten, die Sarkosporidien des Schafes zu differenzieren und stellten bei natürlich infizierten Tieren Mischinfektionen mit S. ovifelis (large form) und S. ovicanis (small form) fest. Mit der KBR wiesen sie ab dem 15. Tag nach experimenteller Infektion Antikörper nach. Sie machten aber keine Angaben über die Titerhöhen.

BOCH und Mitarb. (1979) untersuchten Schlachtschafe auf Sarkosporidien. 55,6% der parasitologisch positiven Tiere hatten Mischinfektionen mit S. ovicanis und S. spec. Bei parallel durchgeführten Serumuntersuchungen mit dem ELISA nahm mit steigendem Serumtiter der Anteil der parasitologisch negativen Tiere ab. Bei einem Titer von 1:256 waren 15 von 16 Tieren, bei Schafen mit höheren Titern alle parasitologisch positiv.

ROSCHER (1980) infizierte 6 Schafe mit je 50 000 und 3 Schafe mit je 5 000 Sporozysten von S. ovicanis. Bei Biopsien, die am 71., 85., 105., 140. und am 152. Tag durchgeführt wurden, fiel bei allen Tieren am 152. Tag p.i. eine Abnahme der Zystenzahl auf. Auch verloren viele Zysten ihre Vorwölbungen und zeigten nur noch schollige Auflagerungen. Ferner konnten zelluläre Reaktionen um die Zysten beobachtet werden. Tiere, die am 232. Tag geschlachtet wurden, enthielten nur wenige, jedoch noch infektionstüchtige Zysten. Schafe, die am 159. Tag erneut

mit einer homologen bzw. heterologen (S. ovifelis) Art reinfiziert wurden, wiesen bei der Biopsie keine unreifen Zysten auf; es muß hier allerdings einschränkend gesagt werden, daß Zysten von S. ovifelis erst nach einem Jahr sicher nachweisbar sind. Klinische Symptome traten bei diesen Tieren zu keiner Zeit auf. Antikörpertiter von 1:160 im IFAT traten bereits am 4. bis 11. Tag p.i. auf. Zwischen dem 21. und dem 28. Tag wurden Maximaltiter von 1:1280 erreicht; ab dem 80. Tag hielten die Titer Höhen von 1:80 bis 1:160. Der IHA wurde zwischen dem 7. und dem 14. Tag nach der Infektion positiv. Maximalwerte von 1:1280 bis 1:10240 traten 41 bis 85 Tage p.i. auf. Sowohl im IFAT als auch im IHA hatten die unterschiedlichen Dosierungen (50 000 bzw. 5 000 Sporozysten je Tier) keine nennenswerten Unterschiede zur Folge. Reinfektionen bewirkten im IFAT und im IHA vorübergehende Titeranstiege. Unterschiede zwischen heterologen und homologen Reinfektionen waren nicht festzustellen.

c) Schwein. BOCH, MANNEWITZ und ERBER (1978) konnten bei 122 Schlachtschweinen Zysten isolieren und stellten bei 11 Mischinfektionen mit S. suicanis und S. suihominis fest. Nach ERBER und GEISEL (1979) kam es während der latenten Infektionsphase zu einer Schädigung der Muskulatur und zu Entzündungsprozessen. In Biopsiematerial bzw. Fleischproben waren 71, 75 und 84 Tage p.i. reife S. suicanis-Zysten zahlreich zu finden; dagegen ließen sich nach 162 Tagen nur noch wenige und am 202. Tag keine Zysten mehr nachweisen. Superinfektionen mit der homologen Art waren nicht möglich; dagegen gelang die Infektion mit der heterologen Art S. suihominis bei 3 Schweinen am 106. Tag. KLIMA (1979) untersuchte Seren experimentell infizierter Tiere im ELISA und stellte ab dem 15. Tag p.i. geringe, ab dem 40. Tag deutliche und am 70. Tag (Schlachtung) Titer von 1:128 fest. Reinfektionen am 40. und am 70. Tag beeinflußten die Titerhöhe nicht. Bei der Überprüfung von Schlachtschweinen hatten parasitologisch negative Sauen nur Titer von 1:32 und darunter; dagegen waren Tiere mit Titern von 1:64 und 1:128 immer parasitologisch positiv.

d) Nager. Bei Infektionen von Mäusen mit S. muris traten bei stark befallenen Tieren Zystendegenerationen auf, die mit zellulären Reaktionen einhergehen (RUIZ und FRENKEL, 1976). Andererseits waren bei erfolgreichen Reinfektionen kleine, schmale Zysten neben großen vorhanden. Leider fehlen Angaben über den Zeitpunkt der Reinfektion und über die Höhe der Dosierungen. Serologische Untersuchungen erbrachten im IFAT Titer bis zu 1:4000. Auch BLEDSOE (1980) beobachtete Zellinfiltrationen bei experimentell mit S.idahoensis infizierten Hirschmäusen, die sehr viele Zysten enthielten.

Serologische Untersuchungen mit dem IFAT am unspezifischen Zwischenwirt führten ARYEETEY und PIEKARSKI (1975) durch. Sie verfütterten S. tenella- bzw. S. fusiformishaltiges Fleisch an Ratten, welches unterschiedlich behandelt worden war. Nur nach Verzehr von rohem, unbehandeltem Fleisch traten Antikörpertiter von 1:256 auf. Bis zum 42. Tag reagierten homologe und heterologe Antigene gleich; später waren bei Verwendung von homologem Antigen höhere Titer nachzuweisen als mit dem heterologen.

Der Entwicklungszyklus der von MIESCHER (1843) entdeckten Sarcocystis muris wurde von RUIZ und FRENKEL (1976) aufgeklärt. Sie verfütterten Muskulatur einer Maus mit weißen intramuskulären Streifen an eine Katze, die daraufhin sporulierte Sporozysten zwischen dem 8. und dem 17. Tag ausschied. Bei eingehenden Untersuchungen zeigte sich, daß im Endwirt 3 bis 6 Stunden nach Infektion die Zoiten das Darmepithel durchdringen und sich abrunden. Nach 12 Stunden sind Makrogamonten und Mikrogamonten zu sehen. Die Makrogamonten wandern in Richtung Basalmembran oder in die Lamina propria; dort kommt es zur Befruchtung und zur Bildung von Oozysten. Zwischen 72 und 96 Std. bilden sich Sporozysten aus, die am 5. bis 6. Tag sporuliert sind. Nach einer Präpatenzzeit von 8 bis 11 Tagen werden 3 bis 81 Tage (im allgemeinen 5 bis 10 Tage) sporulierte Sporozysten, nur selten Oozysten ausgeschieden. Diese Sporozysten messen 8,7-11,7 x 7,5-9,0 µm (10,3 x 8,5 µm).

Im Zwischenwirt beobachteten RUIZ und FRENKEL (1979) nach oralen Gaben von Sporozysten aus den Fäces der Katze 11 bis 17 Tage später in der Leber eine Schizogonie. Weitere Schizogonien in anderen Organen wurden nicht festgestellt. 28 Tage p.i. erschienen in der Skelettmuskulatur die ersten Zysten, die einige Metrozyten enthielten und 20-40 µm groß waren. 76 Tage alte Zysten erwiesen sich als infektiös. 100 Tage nach der Infektion konnte man die Zysten makroskopisch sehen; sie hatten eine dünne Wand ohne Vorwölbung und enthielten Tausende bananenförmige, 14-16 x 4-6 µm große Zystozoiten. Die gesamte quergestreifte Muskulatur enthielt Zysten; dagegen fehlten sie im Herzmuskel. Geschädigte Zysten waren von granulozytären und mononuklearen Infiltraten umgeben.

Elektronenoptisch untersuchten SHEFFIELD, FRENKEL und RUIZ (1977) S. muris-Zysten. Bei 40 Tage alten fanden sie ausschließlich Metrozyten, die in eine fein granulierte Grundsubstanz eingebettet waren und sich durch Endodyogenie vermehrten. Ab dem 53. Tag waren Zysten zu finden, die vornehmlich im Zentrum bananenförmige Zystozoiten enthielten und gekammert waren. Allerdings waren auch nach 325 Tagen noch einzelne Metrozyten am Zystenrand vorhanden. Diese Zysten zeigten keine Veränderung der Zystenwand, obwohl RUIZ und FRENKEL (1976) in früheren Untersuchungen Degenerationen und zelluläre Infiltrationen beobachtet hatten.

CERNA (1976) fand bei der Untersuchung von Schleiereulenkot 11-14 x 8-11 µm große sporulierte Sporozysten. Mit diesem Material infizierte Feldmäuse (Microtus arvalis) blieben negativ, während sich in Labormäusen (Mus musculus) Sarkosporidienzysten in Skelettmuskulatur, Diaphragma, Herz und Lunge entwickelten, die 5-9 x 2 µm große Zoiten enthielten. Die Verfütterung von zystenhaltiger Muskulatur führte bei Schleiereulen (Tyto alba) mindestens 7 Tage lang zu einer massiven Ausscheidung von Sporozysten ab dem 9. Tag, bei Waldohreulen (Asio otus) zu einer geringgradigen Ausscheidung ab dem 10. Tag (CERNA, KOLAROVA und SULC, 1978). Die Entwicklung von Sarcocystis dispersa im Zwischenwirt hat CERNA (1977) im einzelnen untersucht. Nach Inokulation treten in der Leber nach 4-5 Tagen ungeschlechtliche Vermehrungsstadien auf. Am 6. Tag p.i. liegen Schizonten in Rosettenform in den Leberzellen vor. 7 Tage p.i. tauchen die ersten Merozoiten in

der Muskulatur auf, die dann ab dem 10. Tag Zysten bilden. 20 Tage alte Zysten sind bereits 80-90 x 20-30 µm groß und mit ovoiden Metrozyten sowie mit bananenförmigen Zystozoiten gefüllt. Auch Zunge und Herz sind befallen. Nach 3 Monaten ist die Muskulatur mit makroskopisch sichtbaren Zysten durchsetzt. Die zu diesem Zeitpunkt infektiöse Zyste weist eine lichtmikroskopisch sichtbare Kammerung auf, ihre Wand ist zahnradähnlich mit 1 µm langen Vorwölbungen strukturiert. Elektronenmikroskopisch (SENAUD und CERNA, 1978) bestehen diese Vorwölbungen aus fingerförmigen Ausstülpungen der Membran mit regelmäßigen parallelen Falten ohne fibrilläre Strukturen. Die Septen der Kammern, in denen die Zoiten paketweise liegen, werden durch die granulierte Grundsubstanz gebildet.

III. Eigene Untersuchungen

A. Material und Methoden

Als Versuchstiere verwendete ich 301 Schwarzmäuse, hervorgegangen aus einer Kreuzung einer NMRI-Maus und einer gefangenen wilden Hausmaus, die hier im Hause gezüchtet wurden. In Vorversuchen hatten sich diese Tiere für Sarcocystis als besonders empfänglich erwiesen. Das Ausgangsmaterial hat mir Herr Prof. Dr. Krampitz in dankenswerter Weise zur Verfügung gestellt. Die Versuchsmäuse wurden mit Pellets der Firma ALTROMIN ad libitum gefüttert und in Makrolonkäfigen gehalten.

Das Infektionsmaterial von Sarcocystis muris gewann ich durch Verfütterung zystenhaltiger Mäusemuskulatur an Katzen. Diese wurden 13 Tage p.i. getötet. Den Darm zerkleinerte ich im Mixer und verdaute ihn 4 Stunden mit Pepsinlösung auf dem Magnetrührer. Die Verdauungslösung bestand aus 5 g Pepsin (30 000 E/g, MERCK Nr. 7190) und 5 ml HCL (37%) in 1000 ml H_2O von 40°C (BUNDESGESETZBLATT, 1977). Nach Zentrifugieren und 2maligem Waschen in Wasser (mit 800 x g) resuspendierte ich das Sediment nach Zugabe von 3 ml 1n NaOH mit Trypsinlösung (0,25% Trypsin 1:250, Difco Nr. 0152-15, in PBS, pH 7,4; ERBER, 1977) und verdaute es eine weitere Stunde. Nach 3maligem erneutem Waschen wurde das Sediment mit etwas Wasser aufgeschwemmt, 1 ml 2,5%iges Kaliumdichromat pro 50 ml hinzugegeben und die Anzahl Sporozysten in 1 ml bestimmt. Das Material wurde bis zum Gebrauch im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt.
Sporozysten von Sarcocystis dispersa wurden mir freundlicherweise von Frau CERNA, Prag, übersandt, wofür ich mich herzlich bedanke.

Die Infektion der Versuchsmäuse erfolgte oral mittels Knopfkanüle; die Zahl der Sporozysten wurden auf ein Inokulationsvolumen von 0,2 ml verdünnt. Vor jeder Infektion wurde ein Tier der Gruppe getötet und auf Parasitenfreiheit untersucht. Um Schmierinfektionen durch die sehr widerstandsfähigen Sporozysten zu vermeiden, infizierte ich die Tiere im Labor. Nach einem Tag wurden die Mäuse in autoklavierte Käfige umgesetzt und in den eigentlichen Tierstall verbracht.

Zur parasitologischen Untersuchung (Bestimmung der Zystenzahl) der Tiere fertigte ich Gefrierschnitte von 10 µm Dicke von der Zunge 1 mm proximal der Zungenspitze und von der Oberschenkelmuskulatur (M. quadriceps femoris), quer etwa in der Mitte des Muskels, an. Die Schnitte wurden mit Diff-Quik (Firma HARLECO, Herstal/Belgien) gefärbt. Jeweils 10 Schnitte von Zunge und Oberschenkel wurden pro Tier ausgezählt. Bei der Zunge zählte ich den ganzen Querschnitt aus und beim Oberschenkel ein Blickfeld in der Mitte des M. vastus femoris (Vergrößerung 160 x Objektiv 16/0,40, LEITZ; Fläche ~1 mm^2).

Um durch den Parasitenbefall ausgelöste zelluläre Reaktionen abzuklären, bettete ich Oberschenkelmuskulatur auch in Paraffin ein und färbte die 6 µm dicken Schnitte mit Hämalaun-Eosin.

Die Zystendifferenzierung auf Alter und Art sowie die Ermittlung der jeweiligen Anzahl führte ich einmal mit dem Kompressorium durch; ich preßte ein 0,025 g schweres Stück der seitlichen Bauchwand (0,5 cm Ø) und bestimmte die Zahl der aus der Muskulatur herausgedrückten reifen und unreifen Zysten. Zum anderen schüttelte ich die gesamte Bauchwand nach der von ERBER (1977) beschriebenen Methode aus und konnte mit der 40fachen Vergrößerung die Zysten differenzieren und auszählen.

Die Kontrollen sowie die Tiere, die sich als negativ im Kompressorium, im ausgeschüttelten Präparat und in der histologischen Untersuchung erwiesen, überprüfte ich mit Hilfe der Trypsin-Verdauungsmethode (ERBER, 1977).

Als Antigen für die Serologie benutzte ich Zoiten von S. muris und S. dispersa, die ich von meinen Versuchstieren durch tryptische Verdauung von befallener Muskulatur gewann. Dazu zerkleinerte ich den abgehäuteten und ausgenommenen Körper der Maus und gab dazu die Trypsinlösung. Nach 1/2, 1 1/2 und 3 Stunden dekantierte ich die Flüssigkeit; sie enthielt in ziemlich reiner Form die intakten Zoiten. Nach 2maligem Waschen in PBS durch Zentrifugieren bei 800 x g 5 Minuten lang wurde der Bodensatz mit den gepackten Zoiten mit etwas PBS resuspendiert und in Eppendorf-Gefäßen eingefroren. Nach 2 x Auftauen und Wiedereinfrieren waren lichtmikroskopisch keine intakten Zoiten mehr festzustellen. 3 ml dieser Suspension wurden mit 2 ml Aqua dest. plus

2 Tropfen Natriumazid (1%ig) versetzt und 20 Minuten im Eiswasserbad mit dem Zellhomogenisator zerrieben. Anschließend erfolgte über Nacht (14 Std.) die Extraktion im Kühlschrank mit dem Magnetrührer. Nach Zentrifugation der Suspension bei 3000 x g 20 Minuten stellte der Überstand das Extraktantigen dar, welches in Portionen von 0,2 ml in Eppendorf-Gefäßen eingefroren wurde.

Dieses Antigen verwendete ich nach der Bestimmung des Eiweißgehaltes mit FOLIN-CIOCALTEU-Reagenz für den ELISA im Mikrosystem (KLIMA, 1979). Dazu verdünnte ich es mit PBS pH 7,4 auf eine Proteinkonzentration von 50 µg/ml. In jede Vertiefung der Polystyrol-Mikrotiterplatte gab ich 50 µl der Antigenlösung. Die Platten wurden 3 Stunden bei 37°C und dann über Nacht im Kühlschrank bei 4°C inkubiert. Nach Auswaschen der Antigenlösung mit Leitungswasser gab ich in die erste Lochreihe jeweils 75 µl, in jedes weitere Loch 50 µl 0,5%iges PBS-BSA (BSA: bovines Serumalbumin). Dann setzte ich in die erste Lochreihe 25 µl Serum zu und verdünnte die Seren mit dem Mikrodiluter. Nach 1stündigem Inkubieren bei 37°C wusch ich die Platten aus und gab in jedes Loch 50 µl Peroxidase-markiertes Anti-Maus-Globulin der Firma PAESEL/Frankfurt in der Verdünnung 1:100 mit 4%igem PBS-BSA. Anschließend wurde 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Nach Auswaschen der Platten füllte ich 100 µl Substrat (KLIMA, 1979) hinzu. Nach 1 Stunde wurde der Test mit Hilfe des TITERTEK-MULTISKAN (Fa. Flow Labor.) abgelesen und die erhaltenen Extinktionswerte auf Titerhöhen umgerechnet.

Für den indirekten Hämagglutinationstest (IHA) wurde das Extraktantigen auf pH 6,4 umgepuffert (in Phosphatpuffer pH 6,4:75,4 Teile einer Lösung von 9,073 x g KH_2PO_4/l und 24,6 Teile von 11,87 g $Na_2HPO_4 \cdot 2\,H_2O$/l) und dann 20 Minuten mit 60 000 x g zentrifugiert. Der Überstand stellte das Antigen dar, dessen Eiweißkonzentration bestimmt wurde. Das IHA-Reagenz stellte ich nach MEUWISSEN et al.(1972) her. Dazu nahm ich von institutseigenen Schafen Blut, verdünnte es 1:3 mit ALSEVER's Lösung (20,5 g Glucose, 8,0 g Na-Citrat, 4,2 g NaCL und 0,55 g Zitronensäure/l bei pH 6,1) und ließ es einige Tage im Kühlschrank (4°C) stehen. Danach wusch ich es 3 x in PBS pH 7,4

bei 800 x g, suspendierte 1 ml gepackte Erythrozyten in 50 ml einer Lösung von 9,0 g NaCl/l und 20,69 g NaH_2PO_4/l und kühlte die Suspension auf 4°C ab. Zu 96 ml dieser 2%igen Erythrozytenlösung ließ ich tropfenweise 4 ml Glutaraldehyd (25%ig) zulaufen und kühlte die Lösung danach noch 30 Minuten im Kühlschrank auf dem Magnetrührer. Darauf wurde das Glutaraldehyd abzentrifugiert und die Erythrozyten 5mal mit 0,9%iger NaCl-Lösung und 5mal mit Aqua dest. gewaschen. Die fixierten Erythrozyten kontrollierte ich anschließend im Mikroskop auf durch die Fixierung entstandene Agglutinationen. Zur Sensibilisierung der Erythrozyten mit Tannin stellte ich eine 2%ige Lösung in PBS her, gab das gleiche Volumen einer Tanninlösung mit einer Konzentration von 1:5000 dazu und inkubierte 15 Minuten lang bei 37°C. Danach zentrifugierte ich das Tannin ab, wusch die Erythrozyten 2mal in PBS und verdünnte sie mit einer 0,15 molaren NaH_2PO_4-Lösung auf 50%. Dazu fügte ich das gleiche Volumen Antigenlösung mit einer Konzentration von 5 mg Protein/ml und inkubierte 2 Stunden lang bei 37°C.

Die antigenbeladenen Erythrozyten wurden dann 1mal mit 0,15 mol NaH_2PO_4 und 2mal mit 1%igem PBS-BSA gewaschen, um noch eventuell freie Bindungsstellen zu besetzen. Das Reagenz wurde mit 1%igem PBS-BSA auf eine 20%ige Konzentration verdünnt und 2 ml davon in Glasampullen abgefüllt und lyophilisiert. Jeweils 1 Tag vor Gebrauch löste ich die Erythrozyten mit 1,6 ml Aqua dest. auf und ließ sie über Nacht im Kühlschrank stehen. Das Reagenz verdünnte ich dann mit 23 ml 1% PBS-BSA, so daß ich eine 1,6%ige Erythrozytenkonzentration erreichte.

Die Seren für den IHA inaktivierte ich 1/2 Stunde bei 56°C. Den IHA führte ich in Rundbodenmikrotiterplatten durch. In die erste Lochreihe gab ich 150 µl, in jedes weitere Loch 50 µl PBS-Puffer (pH 7,2). Dann kam jeweils in die erste Lochreihe 50 µl Serum, wobei ich bei jedem Versuch eine Reihe ohne Serum (als Erythrozytenkontrolle) und ein negatives und positives Serum mittestete. Die Verdünnung wurde mittels Mikrodiluter durchgeführt und dann 50 µl IHA-Reagenz hinzugefügt. Nach 2 Stunden las ich den Test ab. Als negativ galt ein deutlicher Erythrozytenknopf ohne gefältelten Randsaum, als positiv ein Erythrozytenschleier ohne oder mit deutlich gefälteltem Randsaum.

Das Blut für die serologische Untersuchung wurde jedesmal vor und dann nach der Infektion wöchentlich entnommen. Um die Tiere zu schonen, unterteilte ich jede Versuchsgruppe in Untergruppen zu je 2 Tieren, deren Serum gepoolt wurde; sie wurden alternierend zur Blutentnahme herangezogen. Am Ende jeden Versuches nahm ich das Serum von jedem Tier einzeln.

B. Ergebnisse

1. Einmalige Infektionen

a) mit Sarcocystis muris

Die Infektion mit Sarcocystis muris führte während der Schizogonie und der darauffolgenden Zystenbildung zu keinerlei Krankheitserscheinungen. Erst wenn die Zysten makroskopisch sichtbar sind (etwa nach 90 Tagen), zeigten stark befallene Tiere Bewegungsstörungen. Die Muskulatur erschien geschwollen, was besonders am M. masseter deutlich war. Das Fell wurde stumpf; teilweise fielen die Haare aus, weil die Fellpflege offenbar Schwierigkeiten bereitete.

Bei der Sektion fiel auf, daß das subkutane Fettgewebe weitgehend verschwunden war; auch die Kau- und Zungenmuskulatur waren erheblich befallen. In dieser Phase starben manche Tiere, nachdem einige Tage zuvor eine rapide Verschlechterung des Allgemeinzustandes zu beobachten war.

Die verschiedenen Zystenstadien wurden an 84 Tieren untersucht, als Kontrolle dienten 10 Mäuse. 45 Tage p.i. (12 Versuchstiere) waren die noch unreifen Zysten bis zu 750 µm breit; eine Kammerung fehlte (Abb. 1).

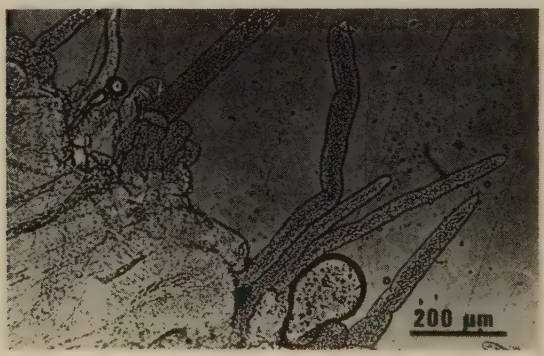

Abb. 1: Unreife Zysten von S. muris (Kompressorium) in der Bauchwand, 45 Tage p.i.

Das Verhältnis von Metrozyten zu Zystozoiten (mit der Trypsinmethode ermittelt) betrug etwa 4:1. Zysten waren besonders zahlreich in der Muskulatur von Vorder-, Hintergliedmaße und Bauchwand vertreten; etwas schwächer sind die Zunge, das Zwerchfell und der Oesophagus befallen. Aus dem Herzmuskel ließen sich weder Zysten (Ausschüttelmethode), noch Zystozoiten (Trypsinmethode) isolieren.

Nach 90 Tagen (12 Versuchstiere) sind die Zysten makroskopisch sichtbar (Abb. 2) und haben eine Größe bis zu 30 x 1 mm.

Abb. 2: Hochgradig mit S. muris befallene Maus, 90 Tage p.i., Ansicht von ventral

Durch die tryptische Verdauung ließen sich nur noch Zystozoiten gewinnen (Abb. 3), die in großer Anzahl gepackt in den gekammerten Zysten liegen (Abb. 4)

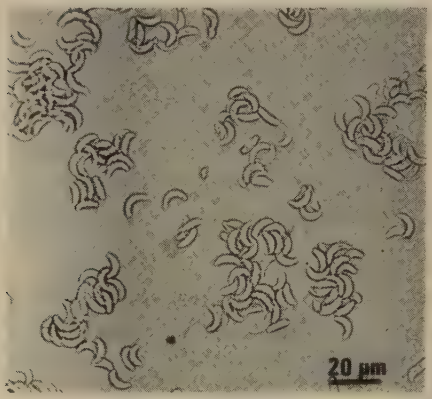

Abb. 3: S. muris, Zystozoiten, gewonnen durch tryptische Verdauung, 90 Tage p.i.

Abb. 4: Reife Zysten, 90 Tage p.i. im Kompressorium, Bauchwand

Parasitenhaltige Muskulatur dieser Tiere, welches an Katzen verfüttert wurde, führte zur Ausscheidung von Sporozysten.

Die Zysten bleiben zum Teil lange Zeit unverändert im Muskelgewebe liegen (Abb. 5). Ein Teil degeneriert jedoch und wird abgebaut.

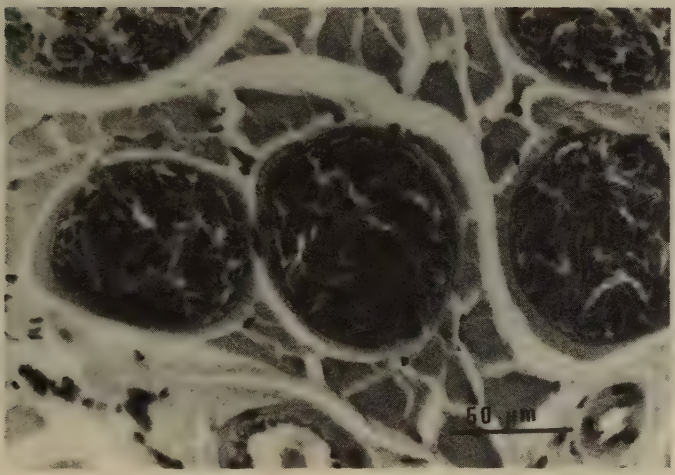

Abb. 5: S. muris, 90 Tage p.i., Oberschenkel, HE-Färbung

Diese Degenerationserscheinungen und Abbaureaktionen ließen sich erstmals 69 Tage p.i. in einem HE-gefärbten Muskelschnitt feststellen. In der Muskulatur sind interstitielle Infiltrate zu sehen, die auch die Zysten umgeben (Abb. 6). Sie bestehen hauptsächlich aus Rundzellen mit einem großen Kern und einem deutlichen Plasmasaum. Die zellulären Infiltrate füllen auch den Innenraum aus. Als Rest bleiben nur noch die Zystenwand und die leeren Kammern bestehen (Abb. 7).

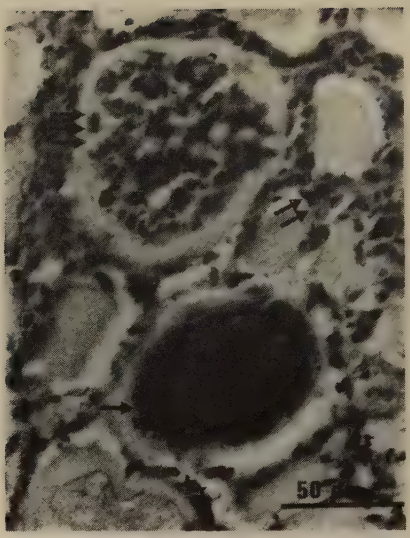

Abb. 6: S. muris, 69 Tage p.i.
Oberschenkel, HE-Färbung
→ = normale, unveränderte Zyste
⇉ = interstitielle Infiltrate
⇉ = Zyste, die mit zellulären Infiltraten ausgefüllt ist

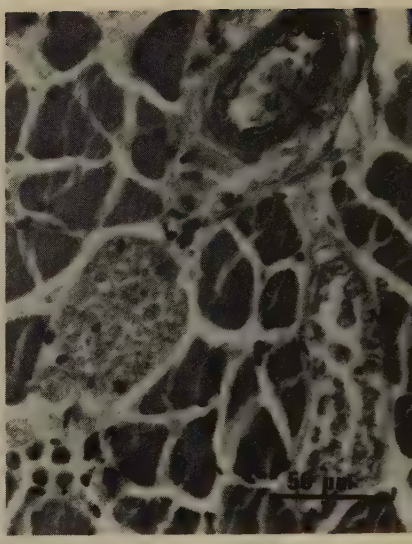

Abb. 7: S. muris, 309 Tage p.i.,
Oberschenkel,
HE-Färbung
Es ist nur noch das leere Gerüst der Zyste zu sehen

Im ausgeschüttelten Präparat sind in den Zysten keine Zoiten mehr zu erkennen, der Inhalt erscheint granuliert. Als einzige Struktur sind noch die Kammerwände zu sehen (Abb. 8).
Tiere, die nach dem 240. Tag p.i. starben bzw. getötet wurden, wiesen entweder gar keine oder sehr wenige Zysten auf, die in der Mehrzahl degeneriert waren. Bei den negativen Tieren ließen sich auch mit der Trypsin-Verdauungsmethode keine Zoiten isolieren. Nur im HE-gefärbten Präparat konnte man einzelne Zystenreste finden.

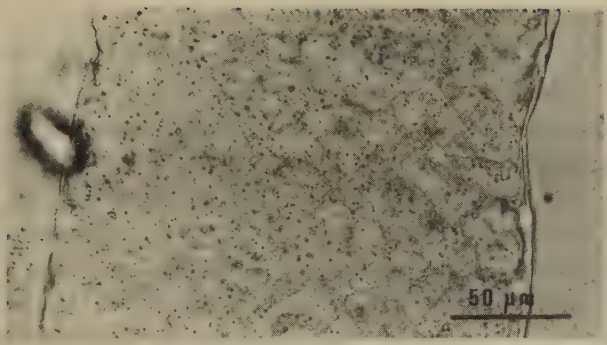

Abb. 8: Degenerierte Zyste von S. muris, 105 Tage p.i., Kammerwände sind nur noch vereinzelt zu erkennen, ausgeschütteltes Präparat

Um die Frage zu klären, inwieweit eine Abhängigkeit zwischen den Infektionsdosen und der Zahl der entstandenen Zysten besteht, bildete ich 4 Gruppen von je 10 Tieren, die 100, 1000, 5000 bzw. 20 000 Sporozysten je Tier erhielten. Die Versuchsgruppen wurden am selben Tag infiziert und nach 50 Tagen zusammen mit 3 Kontrolltieren untersucht.

Zur Bestimmung der Zystenzahl wurden parallel die Zysten der Bauchwand im Kompressorium und im ausgeschüttelten Präparat sowie im Gefrierschnitt von Oberschenkel und Zunge ausgezählt. Dabei zeigte sich, daß bei Dosierungen von 100 und 1000 Sporozysten die Zahl der Zysten in Bauchwand, Kompressorium ($p < 0.05$) und Zunge ($p < 0.005$) entsprechend ansteigt, in der Oberschenkelmuskulatur jedoch weniger wird ($p < 0.05$) (Tab. 1). Bei Dosen von 1000 und 5000 Sporozysten erfolgte keine Zunahme, im Gegenteil, die Zystenzahl nahm z.T. signifikant ab. Auch bei einer Infektion mit 20 000 Sporozysten nahmen die Zystenzahlen in der Bauchwand, Kompressorium ($p < 0.05$), im Oberschenkel ($p < 0.01$) und in der Zunge ($p < 0.05$) signifikant gegenüber den nach 5000 Sporozysten erhaltenen Zysten ab (Abb. 9).
Die Abnahme der Zystenzahl zwischen der Dosis 1000 und 20 000 Sporozysten war immer hochsignifikant ($p < 0.0025$).

Anzahl von Sporozysten	n	Bauchwand K $\bar{x}$	Bauchwand K s	Bauchwand A $\bar{x}$	Bauchwand A s	Oberschenkel $\bar{x}$	Oberschenkel s	Zunge $\bar{x}$	Zunge s
100	11	76,82	34,82	63,82	46,22	24,49	11,25	3,38	1,91
1000	10	127,70	86,97	87,60	61,79	15,88	9,54	9,40	5,81
5000	9	88,44	110,01	27,78	36,49	13,16	14,41	4,51	4,86
20 000	10	20,00	47,85	14,00	31,63	0,62	1,33	0,90	2,30
Kontrolle	3	-	-	-	-	-	-	-	-

Tab. 1: Durchschnittliche Zystenzahl ($\bar{x}$) von S. muris mit Standardabweichung (s), ausgezählt in der Bauchwand (Kompressorium: K, ausgeschütteltes Präparat: A) sowie im histologischen Schnitt von Oberschenkel und Zunge, 50 Tage p.i.

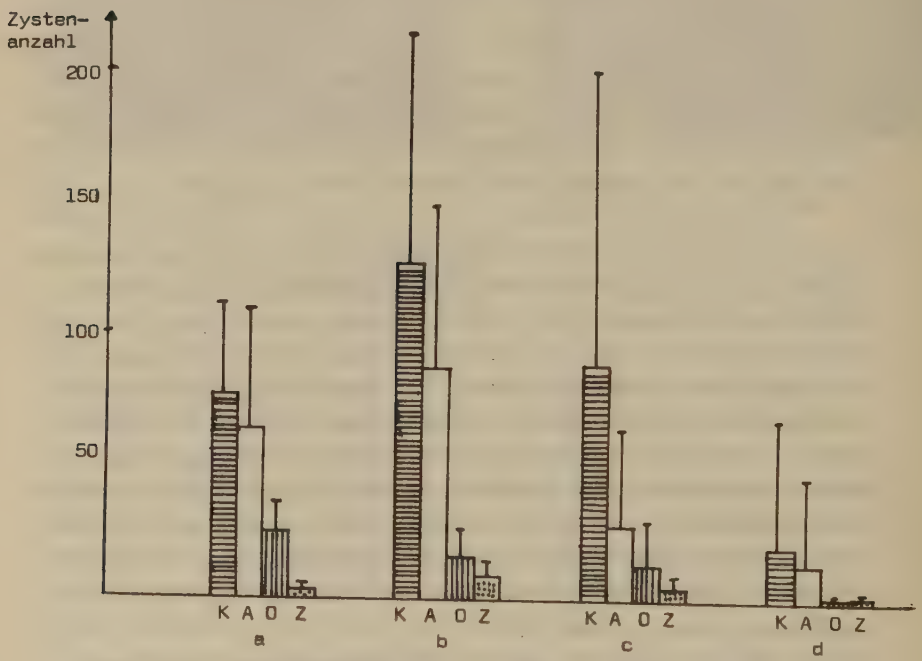

Abb. 9: S. muris-Infektion mit a = 100, b = 1000, c = 5000 und d = 20 000 Sporozysten je Tier. Durchschnittliche Anzahl von Zysten mit Standardabweichung, ermittelt im Kompressorium (K) und ausgeschüttelten Präparat (A) der Bauchwand, im Gefrierschnitt von Oberschenkel (O) und Zunge (Z)

Dabei waren die individuellen Schwankungen sehr groß. Dies zeigen besonders die Ergebnisse mit dem Kompressorium. Hier differieren die Zystenzahlen der Dosis 100 von 15 bis 122 Zysten, bei der Dosis 1000 von 5 bis 268, bei 5000 Sporozysten je Tier von 0 bis 330 und bei der Infektion mit 20 000 von 0 bis 148.

Um die Entwicklung der Serumantikörper zu verfolgen und um zu prüfen, ob die Höhe des Titers von der Infektionsdosis abhängig ist, bildete ich wiederum 4 Gruppen zu jeweils 15 Tieren. Sie wurden mit je 100, 1000, 5000 bzw. 20 000 Sporozysten infiziert.

Im ELISA traten Antikörpertiter (1:64) erstmals zwischen dem 35. und dem 42. Tag p.i. auf. Diese stiegen allmählich an und erreichten ihr Maximum (1:32 768) etwa um den 140. Infektionstag (Abb. 10).

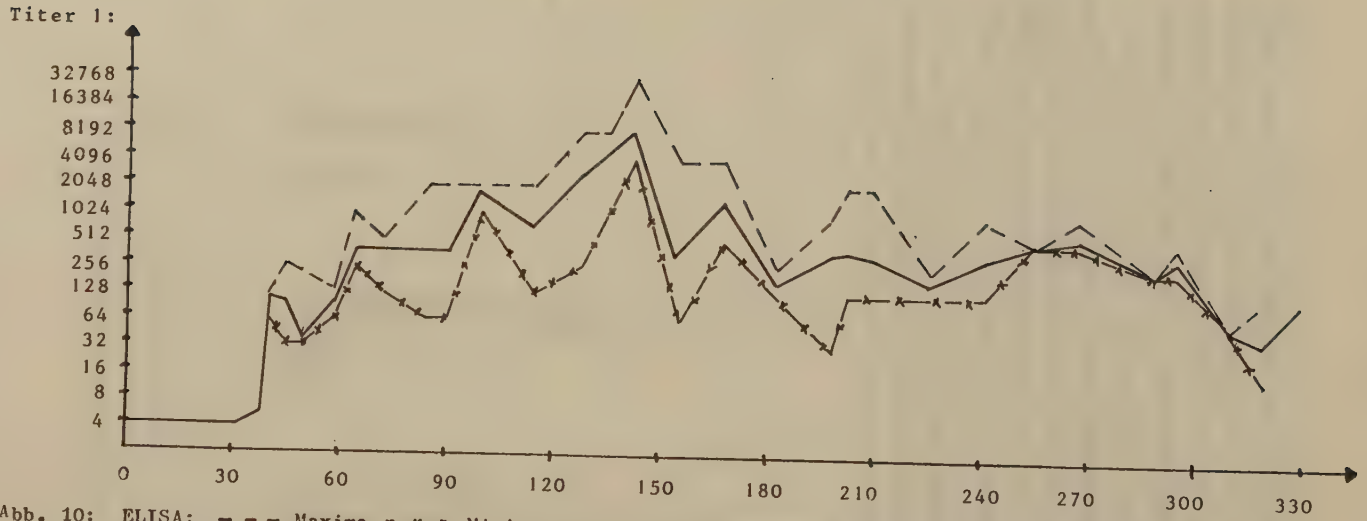

Abb. 10: ELISA: - - - Maxima, x—x—x- Minima und ——resultierende Titerverlaufskurve bei einer einmaligen S. muris-Infektion, S. muris-Antigen; bis zum 241. Tag p.i. Bestimmungen mit gepoolten Seren von je 2 Tieren,,ab 254. Tag p.i. 3 Bestimmungen mit gepoolten Seren von je 2 Tieren, 310. Tag p.i. 2 Bestimmungen mit Seren von je 1 Tier, 330. Tag p.i. 1 Bestimmung mit dem Serum eines Tieres.

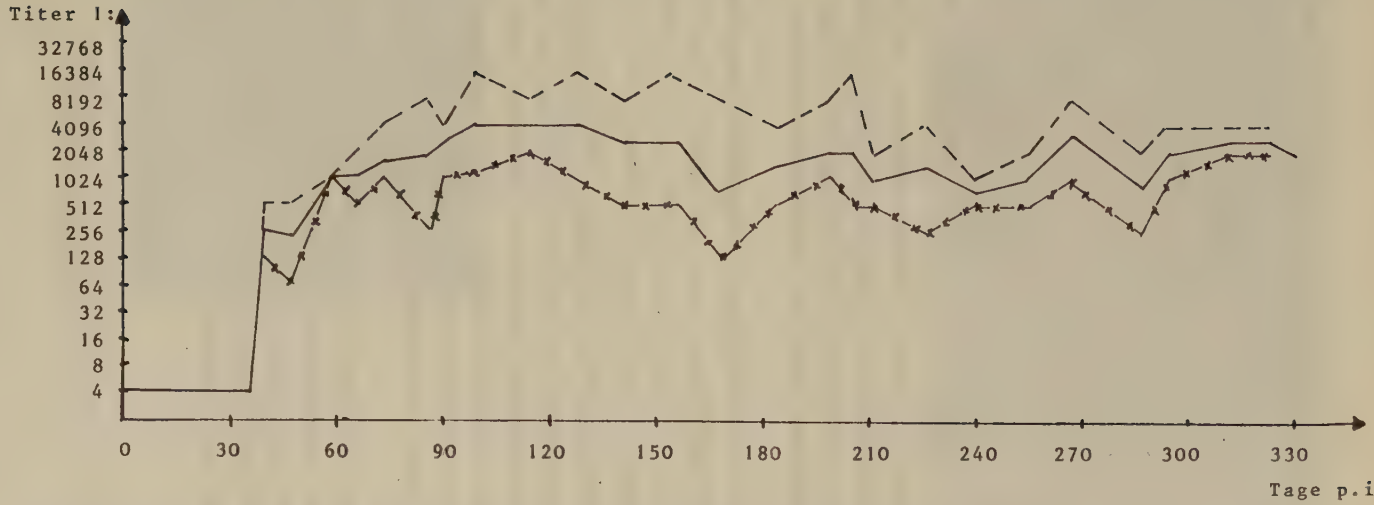

Abb. 11: IHA: – – – Maxima, x–x–x Minima und ——— resultierende Titerverlaufskurve bei einer einmaligen Infektion mit S. muris, S. muris-Antigen; bis zum 241. Tag p.i. 4 Bestimmungen mit gepoolten Seren von je 2 Tieren, ab dem 254. Tag p.i. 3 Bestimmungen mit gepoolten Seren von je 2 Tieren, 310. Tag p.i. 2 Bestimmungen mit Seren von je 1 Tier, 330. Tag p.i. 1 Bestimmung mit dem Serum eines Tieres

Zu diesem Zeitpunkt starben auch viele Tiere mit hohen Titerwerten. Als extremes Beispiel sei ein Tier genannt, das mit 5000 Sporozysten infiziert worden war und am 217. Tag p.i. verendete. Es hatte Titer von 1:4096 (ELISA) bzw. 1:32 768 (IHA); die resultierende Titerverlaufskurve wies zu diesem Zeitpunkt im ELISA 1:256 und im IHA 1:1024 auf. Allgemein fiel nach dem 140. Tag der Titer wieder ab und blieb zwischen dem 220. und dem 330. Tag auf einer Höhe von 1:128 - 1:512.

Die Infektionsdosis hatte keinen Einfluß auf die Titerhöhe und den Zeitpunkt des Titeranstiegs. So differierten bei Tieren der selben Gruppe die Werte bis zu 4 Titerstufen. Interessanterweise ergab die Verwendung von S. dispersa-Antigen um 3-5 Stufen niedrigere Titer.

Die Titerverlaufskurve im IHA (Abb. 11) ähnelt weitgehend der ELISA-Kurve, besonders im Anfangszeitraum. Es wurde aber früher (100 Tage p.i.) ein Plateau von 1:2048 - 1:4096 erreicht. Die Titer blieben dann bis zum Versuchsende auf einer Höhe von 1:1024 $\pm$ 1-2 Stufen.

Nichtinfizierte Kontrolltiere hatten sowohl beim ELISA als auch beim IHA unspezifische Titer von 1:16.

b) Sarcocystis dispersa

Die Infektion mit S. dispersa führte bei 25 Mäusen (Infektionsdosis: 1000 und 5000 Sporozysten) weder zum Zeitpunkt der Schizogonie noch in der Phase der Zystenbildung und -reifung zu sichtbaren Krankheitserscheinungen gegenüber den 3 Kontrolltieren. Obwohl alle Tiere sehr gut empfänglich und stark befallen waren, traten weder Bewegungsstörungen noch die bei S. muris beobachteten Folgeerscheinungen auf.

Schon nach 20 Tagen entwickeln sich bis zu 1500 x 40 µm große Zysten, die fast nur Metrozyten enthalten und noch ungekammert sind. 70 Tage nach der Infektion sind sie bereits makroskopisch sichtbar, enthalten ausschließlich bananenförmige Zystozoiten (5-9 x 2 µm) und sind gekammert. Die Zystenwand zeigt zahnradähnliche Vorwölbungen (abb. 12).

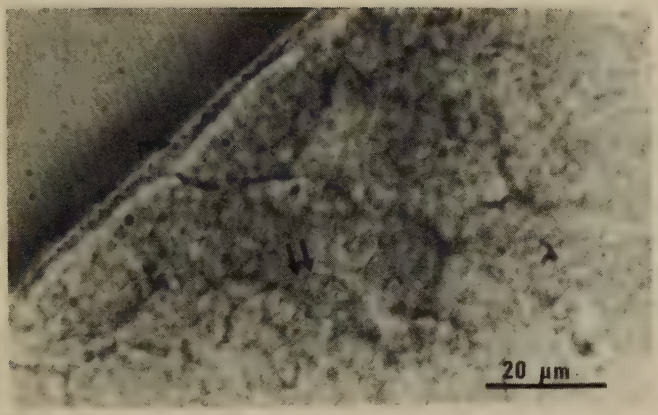

Abb. 12: Reife Zyste von S. dispersa, 70 Tage p.i.,
Bauchwand, ausgeschütteltes Präparat
→ = zahnradähnliche Vorwölbung der Zystenwand
⇉ = Kammerwände

Bevorzugt sind die Muskulatur der Gliedmaßen und der Bauchwand befallen, Zunge und Zwerchfell weisen weniger Zysten auf. Stets sind im Herzmuskel einige Zysten zu finden (Abb. 13). 51 Tage p.i. zeigten sich in einem HE-gefärbten Präparat der Hintergliedmaße interstitielle zelluläre Reaktionen und bei einem Tier am 90. Infektionstag eine im Abbau befindliche Zyste.

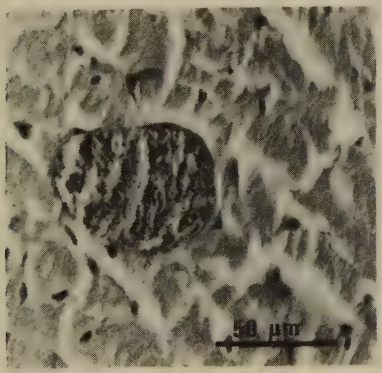

Abb. 13: Reife Zyste von S. dispersa, 90 Tage p.i.,
Herzmuskel, HE-Färbung

Serumantikörper ließen sich mit dem ELISA unter Verwendung des heterologen S. muris-Antigens zwischen dem 49. und 56. Tag p.i. (1:32 - 1:64) nachweisen. Der Gipfel war mit 1:512 am 70. Tag erreicht; dann fiel der Titer allmählich. Bei Verwendung des homologen S. dispersa-Antigens waren die Titer im allgemeinen um 2-3 Stufen höher und erreichten ein Maximum von 1:4096 am 120. Tage p.i. Mit dem IHA ließen sich wesentlich früher (14.-21. Infektionstag) Titer von 1:128 - 1:256 nachweisen. Nach einem weiteren Anstieg mit geringen Schwankungen wurde am 84. Tag p.i. ein Maximaltiter von 1:4096 erreicht. Bei Versuchsende (127. bzw. 139. Tag) bestanden noch Titer von 1:128 - 1:512 (Abb. 14). Als Grenztiter sahen wir sowohl im ELISA (homologes und heterologes Antigen) als auch im IHA 1:16 an. Bei allen Versuchstieren, die einen Titer aufwiesen, konnten bei der Sektion Zysten oder Zystenreste gefunden werden.

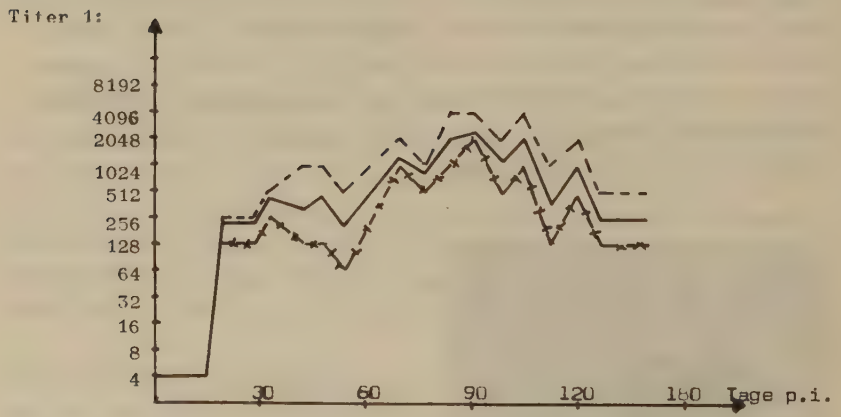

Abb. 14: IHA. - - - Maxima, -x-x- Minima und ——— resultierende Titerverlaufskurve bei einer einmaligen Infektion von Mäusen mit S. dispersa unter Verwendung eines heterologen Antigens; jeweils 2 Bestimmungen mit gepoolten Seren von je 2 Tieren.

2. Mehrmalige Infektionen

a) Sarcocystis muris

Zur Abklärung, ob und wann eine Immunität gegen Superinfektionen auftritt, infizierte ich 50 Mäuse mit je 1000 Sporozysten von S. muris. 9 infizierte Tiere dienten als Kontrollen. 7 Tiere wurden nach 60, 10 nach 90, 6 nach 120 und 1 Maus nach 150 Tagen mit ebenfalls je 1000 Sporozysten reinfiziert. Die restlichen 17 Mäuse waren im Laufe der bestehenden Erstinfektion gestorben. Mit jeder Zweitinfektion erhielt eine Gruppe von 4 Tieren erstmals 1000 Sporozysten je Tier als Kontrolle für die Infektiosität der Sporozysten.

Die gesetzte Zweitinfektion nach 60 Tagen war bei allen Versuchstieren angegangen; allerdings blieb die Zahl der Zysten signifikant niedriger als bei der nur einmal infizierten Kontrollgruppe (4,29 bzw. 221,75 Zysten, $p < 0,025$). Interessanterweise führten Reinfektionen nach 90 Tagen oder später nicht mehr zum Erfolg. Es war ferner auffallend, daß bei allen Mäusen, deren Erstinfektion länger als 120 Tage zurücklag, Zysten Degenerationserscheinungen zeigten.

Die serologische Untersuchung ergab weder im ELISA noch im IHA unterschiedliche Titer gegenüber den nur einmal infizierten Tieren.

Um die Immunitätsentwicklung bei einer dreimaligen Infektion zu überprüfen, wurde als Grunddosis eine Menge von 10, von 100 bzw. von 5000 Sporozysten je Tier in den 3 Versuchsgruppen zu je 15 Mäusen verabreicht. 30 Tage nach der Erstinfektion erhielt jedes Tier 20 000 Sporozysten; 4 bisher Sarkosporidien-freie Tiere dienten als Kontrollen. 77 Tage nach der ersten bzw. 47 Tage nach der zweiten Infektion wurden 5 Tiere je Gruppe untersucht. Es zeigte sich, daß bei allen Tieren sowohl die Erst- als auch die Zweitinfektion angegangen war; dabei traten in der Zystenzahl keine Unterschiede zu den Kontrollen auf. 11 Tiere wurden 78 Tage nach der Erst- bzw. 48 Tage nach der Zweitinfektion mit 1000 Sporozysten zum drittenmal infiziert; 8 Tiere dienten als Kontrolle für die serologische Untersuchung bzw. 4 Mäuse wurden erstmals infiziert, die restlichen 11 Tiere waren zwischenzeitlich verendet.

Von 4 Tieren mit der Grunddosis 10 wurde bei einer Maus im ausgeschüttelten Präparat, von 2 Mäusen mit der Dosis 100 ebenfalls nur bei einem Tier eine junge Zyste nachgewiesen. Von 5 Tieren, die 5000 Sporozysten als Grundinfektion erhalten hatten, war die dritte Infektion bei 2 angegangen. Es wurden 4 bzw. 1 junge Zysten im Kompressorium und bei einem Tier 2 junge Zysten im ausgeschüttelten Präparat festgestellt. Die Kontrolltiere hatten im Durchschnitt 155 (Kompressorium) bzw. 211 Zysten (ausgeschütteltes Sediment) in der Bauchwand (Tab. 2).

Anzahl Mäuse	Sporozystenzahl bei 1.	2. n.30 Tg	3. Inf. n. 77 Tg.	3. Infektion angegangen bei .. Tieren	Durchschnittl. Zahl junger Zysten (aus 3. Infektion) je Tier K	A
4	10	20 000	1000	1	-	1
2	100	20 000	1000	1	1	-
5	5000	20 000	1000	2	2,5	1
4	-	-	1000		155	211

Tab. 2: Anzahl junger S. muris-Zysten in der Bauchwand experimentell infizierter Mäuse, festgestellt mit dem Kompressorium (K) bzw. im Ausschüttelpräparat (A)

Die serologische Untersuchung ergab bei den dreimal infizierten Mäusen weder im ELISA noch im IHA Unterschiede gegenüber den nur einmal infizierten Tieren; es trat kein Boostereffekt auf.

Um die Auswirkungen einer häufigeren Infektion mit geringen Dosen festzustellen, gab ich 15 Mäusen 4 Wochen lang 2 x wöchentlich je 50 Sporozysten. 76 Tage nach der ersten und 51 Tage nach der letzten Infektion zeigten die untersuchten 6 Tiere neben reifen auch unreife Zysten. Diese können aufgrund der Infektionsdauer nur von einer der letzten Infektionen stammen. Bei den restlichen Tieren wurde das Serum bis zum 150. Tag p.i. untersucht und der weitere Verlauf der Infektion beobachtet. Dabei unterschieden sich die Abbaureaktionen weder in ihrem zeitlichen Ablauf noch in ihrer Morphologie von denen der nur einmal infizierten Tiere. Die im ELISA und im IHA festgestellten Antikörper differierten weder in der Anfangsphase noch im späteren Verlauf der Infektion von der Titerhöhe einer einmaligen Infektion.

b) Sarcocystis dispersa

Von 10 mit 1000 Sporozysten von S. dispersa zum erstenmal infizierten Tieren erhielten 7 nach 100 Tagen zum zweitenmal 1000 Sporozysten; die restlichen 3 dienten als Kontrolle für die Erstinfektion, weitere 5 Mäuse als Kontrolle für die Zweitinfektion.

Bei keinem Tier hatte die zweite Infektion Erfolg; dagegen waren bei allen Mäusen reife Zysten von der Erstinfektion vorhanden, deren Anzahl und Größe denen der 3 Kontrollen entsprach. Auch die 5 Kontrolltiere für die Zweitinfektion waren positiv, die Zystenzahlen schwankten zwischen 0 und 8 im Kompressorium und zwischen 3 und 25 im ausgeschüttelten Präparat. Die Serumuntersuchung ergab weder im ELISA noch im IHA Differenzen zwischen einmal und zweimal infizierten Tieren.

c) Sarcocystis muris und Sarcocystis dispersa

Von 4 Tieren, die 1000 Sporozysten von S. muris erhalten hatten, wurden 3 nach 150 Tagen mit jeweils 1000 Sporozysten von S. dispersa infiziert; das 4. Tier wurde zur Serumkontrolle gehalten. Weitere 3 bisher freie Mäuse erhielten 1000 Sporozysten von S. dispersa. Die heterologe Infektion hatte bei allen Tieren Erfolg; die Zystenzahlen differierten nicht deutlich von jenen der Kontrollgruppe. Die Antikörpertiter im ELISA und im IHA der heterolog infizierten Mäuse unterschieden sich nicht von den nur einmal infizierten Tieren.

7 Mäuse erhielten je 1000 Sporozysten von S. dispersa. Davon wurden 5 nach 100 Tagen mit 1000 Sporozysten von S. muris erneut infiziert. 4 Mäusen, die als Kontrolle dienten, wurden zum selben Zeitpunkt 1000 Sporozysten von S. muris verabreicht. Die Zahl der gefundenen jungen Zysten von S. muris bei den heterolog infizierten Tieren entsprach sowohl im Kompressorium wie auch im ausgeschüttelten Präparat in etwa denen der Kontrollen. Die erste Infektion war bei allen Versuchstieren angegangen. Die Serumuntersuchungen im ELISA und IHA ergaben keine Unterschiede zu nur einmal infizierten Mäusen.

Diese Untersuchungsergebnisse verdeutlichen die Tatsache, daß heterologe Infektionen stets angehen; dabei kommt es zu keiner Reduzierung der Zystenzahl.

IV. Besprechnung der Ergebnisse

Die im Verlauf einer einmaligen Infektion untersuchten Parasitenstadien stimmen sowohl bei S. muris als auch bei S. dispersa mit den in der Literatur angegebenen Daten überein (RUIZ und FRENKEL, 1976; ČERNA, 1977). Beide Arten sind gut zu unterscheiden besonders aufgrund ihrer Zoitengröße (11 x 4 µm bei S. muris, 5-9 x 2 µm bei S. dispersa) und ihrer Zystenwandstruktur (glatt bei S. muris, gezähnt bei S. dispersa). Im Gegensatz zu S. muris kommt S. dispersa auch im Herzmuskel vor.

Ein allmählicher Abbau von Zysten wurde bei S. muris und bei S. dispersa beobachtet. Es treten zelluläre Infiltrate auf, die größtenteils aus Makrophagen bestehen. Die Zellen umgeben dann die Zysten, wandern in diese ein und bauen sie ab. BLEDSOE (1980) machte ähnliche Beobachtungen bei mit S.idahoensis infizierten Hirschmäusen. RUIZ und FRENKEL (1976) beschrieben diesen Abbau bei S. muris durch anfangs granulozytäre, später mononukleäre Infiltrate am 113. Tag p.i.; ich konnte jedoch in einem massiv befallenen Tier bereits 69 Tage p.i. Abbaureaktionen feststellen. Auch bei S. suicanis (ERBER und GEISEL, 1979) wurden 81 Tage nach der Infektion ähnliche Vorgänge gefunden. Ferner beobachtete ROSCHER (1980) im Nativpräparat degenerative Veränderungen an Zysten von S. ovicanis 152 Tage p.i. Stärke der Reaktion und Zeitpunkt des Beginns hängen wahrscheinlich von der Menge der Muskelzysten ab, da massiv befallene Tiere diese Reaktionen früher zeigen als solche, die nur wenige Zysten haben.

Die Ursache liegt wohl im Stoffwechsel des Parasiten; zum einen schädigen Stoffwechselprodukte die Muskelfaser und stimulieren dadurch die zelluläre Reaktion, zum anderen kann die Schädigung der Muskulatur über Ernährungsstörungen des Parasiten zur Degeneration und zum folgenden Abbau führen. Als drittes können metabolische Antigene direkt eine Abwehr auslösen. Daneben treten sicher auch mechanische Schädigungen der Zysten auf, durch die Antigen freigesetzt und Reaktionen verursacht werden. Der Abbau von Zysten geht teilweise soweit, daß der Parasit nicht mehr nachweisbar ist. Auch bei S. suicanis (ERBER und GEISEL, 1979) und bei S. bovifelis (BOCH, LAUPHEIMER und ERBER, 1978) wurde ein Verschwinden von Zysten festgestellt.

Die von mir beobachtete geringere Befallsstärke bei höheren Infektionsdosen haben GESTRICH, MEHLHORN und HEYDORN (1975) bereits bei S. bovifelis aufgezeigt. Allerdings war die Infektion 160 Tage gegenüber 98 Tagen des Vergleichstieres alt; die geringere Zystenzahl könnte teilweise auch in dem oben erwähnten Abbau ihre Ursache haben. Als Grund für die Dosisumkehr bei höheren Sporozystenzahlen nehme ich einen Übervölkerungseffekt (crowding-effect) oder auch eine stärkere Stimulierung des Abwehrsystems bei einer größeren Antigenmenge an.

Die bei der S. muris-Infektion beobachteten Titer im ELISA und im IHA unterscheiden sich nur unwesentlich. Der IHA wird früher positiv, zeigt eine größere Streuung und erbringt höhere Titerwerte. Bei S. bovicanis-Befall fanden LUNDE und FAYER (1977) im IHA sowie NEDJARI, JUNGMANN und HIEPE (1976) im IFAT ebenfalls ein relativ spätes Positivwerden. ROSCHER (1980) hatte dagegen bei S. ovicanis schon nach 4 bis 11 Tagen im IFAT und nach 7 bis 18 Tagen im IHA erste Titer. Auch die S. dispersa-Infektion erbrachte nach 20 Tagen deutliche Titer im IHA.

Viele Autoren stellen einen langsamen Anstieg der Titer und nach einem Maximum ein allmähliches Abfallen auf ein länger bestehendes Plateau fest; dies trifft auch für die Antikörperbildung nach S. muris- und S. dispersa-Infektionen zu. Anscheinend ist nicht die Schizogonie das auslösende Moment, sondern die Bildung von Antikörpern ist offenbar die Folge der Zystenbildung und -reifung. Der späte Höhepunkt zeigt, daß die Antikörperbildung durch den Stoffwechsel der sich vergrößernden Zysten und durch freiwerdendes Antigen beim Abbau derselben stimuliert wird. Dafür spricht auch, daß Seren moribunder Tiere hohe Titer aufwiesen. Bei diesen Mäusen waren auch immer umfangreiche Abbauvorgänge an Zysten zu finden.

Mehrmalige Infektionen hatten keinen Einfluß auf die Titerhöhen. Dieselbe Beobachtung machte auch KLIMA (1979) bei S. suicanis. Dagegen stellte ROSCHER (1980) bei S. ovicanis zwischen dem 11. und dem 37. Tag nach der Reinfektion eine Erhöhung um 3-5 Stufen fest. Hier trat also über kurze Zeit ein Booster-Effekt auf. Die Serumantikörper, welche die Mäuse gegen die jeweilige Sarcocystisart entwickelten,

sind nicht streng spezifisch, da sie sich auch mit dem heterologen Antigen nachweisen lassen; die Titer im ELISA lagen jedoch bei Verwendung des homologen Antigens um 3-5 Stufen höher.

Im Verlauf der S. muris- bzw. S. dispersa-Infektion bildet sich eine Immunität, die im Anfangsstadium eine Zweitinfektion zwar nicht verhindert, aber signifikant abschwächt. Bei S. bovicanis-Infektion stellten dies MEHLHORN, HEYDORN und GESTRICH (1974) sowie bei der S. suicanis-Infektion ERBER und GEISEL (1979) ebenfalls fest. Auf den Beginn der Immunität haben mehrmalige Infektionen keinen Einfluß, da nach achtmaliger Ansteckung in kurzen Abständen hintereinander Zysten sowohl von den ersten als auch von den letzten Infektionen nachzuweisen waren. Eine Zweitinfektion nach 30 Tagen konnte das Angehen der dritten nach 78 Tagen nicht in jedem Fall verhindern.

Nach 90 Tagen bei S. muris und nach 100 Tagen bei S. dispersa war die Immunität so stark ausgebildet, daß eine homologe Reinfektion nicht mehr möglich war. RUIZ und FRENKEL (1976) machen keine Angaben über den Zeitpunkt der erfolgreichen Zweitinfektion, möglicherweise lag dieser vor der voll entwickelten Immunität.

Über eine belastbare Immunität berichten ERBER und GEISEL (1979) beim Schwein mit S. suicanis und S. suihominis sowie ROSCHER (1980) beim Schaf mit S. ovicanis. Auch in unseren Versuchen war die Immunität spezifisch, da eine heterologe Infektion mit S. muris bzw. S. dispersa noch zu einem Zeitpunkt anging, an dem eine Immunität gegen homologe Reinfektionen bestand. Ähnliche Beobachtungen wurden auch bei S. suicanis- und S. suihominis-Infektionen gemacht (ERBER und GEISEL, 1979). Diese Befunde wurden auch bei Untersuchungen über das Vorkommen von Sarkosporidien durch die häufigen Mischinfektionen mit mehreren Arten bestätigt, z.B. beim Rind durch BOCH, LAUPHEIMER und ERBER (1978) sowie GESTRICH, MEHLHORN und HEYDORN (1975), beim Schwein durch BOCH, MANNEWITZ und ERBER (1978), beim Schaf durch MUNDAY und RICKARD (1974), BOCH u. Mitarb. (1979) sowie ROSCHER (1980). Ob die Immunität humoraler und/oder zellulärer Natur ist, läßt sich durch die von mir gewählte Versuchsanordnung nicht entscheiden.

V. Zusammenfassung

Die Reaktionen des Zwischenwirtes Maus auf ein- und mehrmalige Infektionen mit Sarcocystis muris und Sarcocystis dispersa wurden untersucht, gleichzeitig erfolgte die Feststellung von Antikörpern in Seren dieser experimentell infizierten Versuchstiere mit Hilfe des IHA und des ELISA.

Nach einer Infektion mit S. muris bzw. S. dispersa kommt es zu zellulären Reaktionen (hauptsächlich mit Makrophagen), die, ausgehend von den Blutgefäßen, die Zysten umgeben und diese abbauen, so daß zuletzt nur noch die Zystenwand und die Kammerung erkennbar sind. Dadurch nimmt die Zystenzahl bei infizierten Tieren im Laufe der Zeit ab.

Eine homologe Reinfektion bei S. muris nach 60 Tagen ist möglich, die Zystenzahl ist jedoch erheblich vermindert. 100 Tage nach der Erstinfektion mit S. dispersa und ab dem 90. Tag nach der Erstinfektion mit S. muris ist eine vollständige Immunität gegenüber homologen Reinfektionen feststellbar. Heterologe Infektionen gehen ohne Reduzierung der Zystenzahl an (untersucht 150 Tage nach einer Infektion mit S. muris und 100 Tage p.i. mit dispersa).

Der Antikörpertiter im Serum nach einer Infektion mit S. muris stieg im ELISA ab dem 40. Tag (1:128) an, überschritt seinen Höhepunkt (1:8192) am 143. Tag und hielt sich bis Versuchsende (330. Tag) auf einem Plateau von 1:128. Der Anstieg im IHA war zur selben Zeit, der Höhepunkt wurde am 120. Tag erreicht, wobei die Titer höhere Werte als im ELISA aufwiesen. Nach einer Infektion mit S. dispersa treten im IHA Titer schon ab dem 20. Tag p.i. auf. Mehrmalige homologe oder heterologe Infektionen zeigten sowohl im IHA als auch im ELISA keine Auswirkungen auf den Titerverlauf, der dem von nur einmal infizierten Tieren entsprach.

HOFER, J.: Investigations on the development of Sarcocystis muris and Sarcocystis dispersa in the mouse and on the reactions of the intermediate host after single and repeated experimental infections

Summary

Immune reactions of the intermediate host (mouse) were investigated after single and repeated infections with Sarcocystis muris and S. dispersa. Antibodies to these S. spp. were detected by means of the indirect hemagglutination test (IHAT) and the enzyme linked immunosorbent assay (ELISA).

Cellular reactions (predominantly macrophages) were detected after infections with both Sarcocystis species. These reactions were perivascular initially and the cysts were gradually surrounded and destroyed. Finally, only cyst walls and the septa were visible. A reduction in the number of cysts in the infected animals was thusly observed during the course of infection.

Homologous reinfection was successful with S. muris after 60 days post inoculation (p.i.) but the number of cysts was considerably reduced. A complete immunity to homologous reinfection was observed 100 days p.i. in S. dispersa infected mice and after 90 days p.i. in S. muris infected mice. In the contrary, heterologous infections were successful without reduction in the number of cysts (investigated 150 days p.i. with S. muris and 100 days p.i. with S. dispersa).

The antibody titres observed following a S. muris infection demonstrated by means of the ELISA increased from day 40 (1:128). Maximum titres (1:8192) were reached on day 143. Thereafter the titres declined and maintained a level of 1:128 until the end of the experiment (day 330). The IHAT showed titre increases at the same time. Maximum titres were reached on day 120 and were higher than those in the ELISA. Serological investigation after S. dispersa infection showed significant titre increases from day 20 onwards with the IHAT. Repeated homologous or heterologous infections were found to have no influence on antibody formation.

VI. Literaturverzeichnis

Aryeetey, M.E., G. Piekarski (1975): Serologische Sarcocystis-Studien an Menschen und Ratten. Z. Parasitenk. 50, 109-124

Bledsoe, B. (1980): Sarcocystis idahoensis sp.n. in deer mice Peromyscus maniculatus (Wagner) und gopher snakes Pituophis melanoleucus (Daudin). J. Protozool. 27, 93-102

Boch, J., K.E. Laupheimer, M. Erber (1978): Drei Sarkosporidienarten bei Schlachtrindern in Süddeutschland. Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 91, 426-431

Boch, J., U. Mannewitz, M. Erber (1978): Sarkosporidien bei Schlachtschweinen in Süddeutschland. Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 91, 106-111

Boch, J., A. Bierschenk, M. Erber, G. Weiland (1979): Sarcocystis- und Toxoplasma-Infektionen bei Schlachtschafen in Bayern. Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 92, 137-141

Bundesgesetzblatt (1977/I): Anlage 5 zu § 38 Abs. 4 der Ausführungsbestimmungen A zum Fleischbeschaugesetz. Bgbl. 1977, Teil I, 2532

Černa, Z. (1976): Relationship of oocysts of "Isospora buteonis" from the barn-owl (Tyto alba) to muscle cysts of sarcosporidians from the house mouse (Mus musculus). Fol. parasitol. 23, 285

Černa, Z. (1977): Cycle de développement sarcosporidien d'une coccidie, chez la souris, après infestation des oocystes-sporocystes isolés de l'intestin de la chouette effraie (Tyto alba). Protistologica XIII, 401-405

Černa, Z., I. Kolarova, P. Sulc (1977): Sarcocystis cernae Levine, 1977, excystation, life-cycle and comparison with other heteroxenous coccidians from rodents and birds. Fol. parasitol. 25, 201-207

Erber, M. (1977): Möglichkeiten des Nachweises und der Differenzierung von zwei Sarcocystisarten des Schweines. Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 90, 480-482

Erber, M., O. Geisel (1979): Untersuchungen zur Klinik und Pathologie der Sarcocystis-suicanis-Infektion beim Schwein. Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 92, 197-202

Gestrich, R., H. Mehlhorn, A.O. Heydorn (1975): Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen an Cysten von Sarcocystis fusiformis in der Muskulatur von Kälbern nach experimenteller Infektion mit Oocysten der großen Form von Isospora bigemina der Katze. Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig. A. 233, 261-276

Gestrich, R., A.O. Heydorn, N. Baysu (1975): Beiträge zum Lebenszyklus der Sarkosporidien. VI. Untersuchungen zur Artendifferenzierung bei Sarcocystis fusiformis und Sarcocystis tenella. Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 88, 191-197

Klima, U. (1979): Versuche zum Nachweis von Sarkosporidien-Infektionen bei Haustieren mit dem Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay (ELISA). Vet. med. Diss., München

Lunde, M.N., R. Fayer (1977): Serologic tests for antibody to Sarcocystis in cattle. J. Parasitol. 63, 222-225

Mehlhorn, H., A.O. Heydorn, R. Gestrich (1975): Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen an Cysten von Sarcocystis fusiformis in der Muskulatur von Kälbern nach experimenteller Infektion mit Oocysten und Sporocysten der großen Form von Isospora bigemina des Hundes. 1. Zur Entstehung der Cyste und der "Cystenwand". Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A 232, 392-409

Meuwissen, J.H.E.Th., A.D.E.M. Leeuwenberg, G.E. Molenkamp (1972): Studies on various aspects of the indirect haemagglutination test for malaria. Bull. Wld. Hlth. Org. 46, 771-782

Miescher, F. (1843): Über eigenthümliche Schläuche in den Muskeln einer Hausmaus. Bericht Verh. Naturf. Gesellsch. Basel, 5, 192-202

Munday, B.L., M.D. Rickard (1974): Is Sarcocystis tenella two species? Australian Vet. J. 50, 558-559

Nedjari, T., R. Jungmann, Th. Hiepe (1976): Immundiagnostischer Nachweis einer experimentellen Sarcocystis bovicanis-Infektion beim Rind mit der indirekten Fluoreszenz-Antikörper-Reaktion. Monatsh. Vet. Med. 31, 946-947

Roscher, B. (1980): Die Erarbeitung serologischer Verfahren (IFAT, IHA) zum Nachweis einer Sarcocystis-Infektion beim Schaf. Vet. med. Diss., München

Ruiz, A., J.K. Frenkel (1976): Recognition of cyclic transmission of Sarcocystis muris by cats. J. Inf. Dis. 133, 409-417

Senaud, J., Z. Černa (1978): Le cycle de développement asexué de Sarcocystis dispersa (Cerna, Kolarova et Sulc, 1977) chez la souris: étude au microscope électronique. Protistologica XIV, 155-176

Sheffield, H.G., J.K. Frenkel, A. Ruiz (1977): Ultrastructure of the cyst of Sarcocystis muris. J. Parasitol. 63, 629-641

Tadros, W., W. Hazelhoff, J.J. Laarman (1979): The detection of circulating antibodies against Sarcocystis in human and bovine sera by the enzyme-linked-immunosorbent assay (ELISA) technique. Acta Leidensia 47, 53-63

Tadros, W., J.J. Laarman (1976): Sarcocystis and related coccidian parasites: a brief general review, together with a discussion on some biological aspects of their life cycles and a new proposal for their classification. Acta Leidensia 44, 1-107

Herrn Professor Dr. Dr. h.c. J. Boch gilt mein besonderer Dank für die Erstellung des Themas und die wissenschaftliche Anleitung. Er hat diese Arbeit unter besten Bedingungen ermöglicht.

Für die freundliche Beratung und die praktische Unterstützung bei meinen Versuchen danke ich Herrn Dr. Erber recht herzlich.

Frau Z. Cerna, Prag danke ich an dieser Stelle noch einmal herzlich für die Übersendung des Infektionsmaterials.

Allen technischen Mitarbeitern im Hause, insbesondere Fräulein Englmann danke ich dafür, daß sie mir mit Rat und Tat stets zur Seite standen.

L E B E N S L A U F

Name: Josef Benedikt Hofer

Geboran am 19.11.1951 in Obergünzburg, Kreis Ostallgäu

Eltern: Peter Hofer
Maria Hofer, geb. Endres

Schulen:

1958-1966 Volksschule in Sellthüren/Ostallgäu

1966-1969 Landwirtschaftliche Berufsschule in Obergünzburg

1967-1970 Berufsaufbauschule in Kempten/Allgäu

1970-1973 Bayernkolleg in Augsburg

1973 Reifeprüfung am Bayernkolleg in Augsburg

Studium:

1974-1979 Studium der Veterinärmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität in München

Oktober 1979 Staatsexamen

Seit November 1979 Anfertigung der Dissertationsarbeit am Institut für Vergleichende Tropenmedizin und Parasitologie der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität in München.